

RESEARCH ARTICLE

일반 PCR과 Real-time PCR을 이용한 탄저병균 *Colletotrichum circinans* 검출

김준영

단국대학교 자연과학대학 미생물학과

Detection of Anthracnose Fungus *Colletotrichum circinans* by Conventional PCR and Real-time PCR

Jun Young Kim

Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 31161, Korea

*Corresponding author: eyessun@naver.com

ABSTRACT

Colletotrichum circinans, an anthracnose pathogen, causes serious damage to onions worldwide. In this study, specific molecular markers were developed to detect *C. circinans* accurately and quickly with both conventional and real-time PCR methods. The cirTef-F/cirTef-R and cirTu-F/cirTu-R primer sets, which are specific for *C. circinans*, were constructed by analyzing *tef-1α* and β -tubulin genes in the fungus. Using the conventional PCR method, 100 pg and 1 ng of fungal DNA could be detected using the cirTef-F/cirTef-R and cirTu-F/cirTu-R sets, respectively. Using the real-time PCR method, 10 pg and 100 pg of fungal DNA could be detected more sensitively with the cirTef-F/cirTef-R and cirTu-F/cirTu-R sets, respectively. Detection of *C. circinans* from the artificially infected onion seeds was possible by using both conventional and real-time PCR methods and the developed cirTef-F/cirTef-R primer set. The PCR markers specific for *C. circinans* developed in this study may enhance the efficiency of fungal pathogen detection in imported vegetables and seeds.

Keywords: Anthracnose, *Colletotrichum circinans*, Molecular marker

서론

식물에 탄저병을 일으키는 *Colletotrichum*속 진균은 과수와 채소 등 넓은 기주 범위를 갖고 있으며 작물의 잎, 줄기, 열매 등에 궤양과 부패 등의 증상을 일으켜 많은 경제적인 피해를 주고 있다[1,2]. 수출 종자에서 검역대상이 되고 있는 탄저병균은 *C. orbiculare*, *C. coccodes*, *C. circinans* 등이 있고 *C. orbiculare*는 메론, 호박, 오이, 수박 같은 박과 작물에 병을 일으키고, *C. coccodes*는 토마토와 고추 등에 병을 일으키며 *C. circinans*는 양파에 병을 일으킨다[3-5]. 이러한 탄저병균은 종자에 부착하여 잠



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2018 December, 46(4): 467-477
<https://doi.org/10.4489/KJM.20180051>

Received: November 08, 2018

Revised: November 19, 2018

Accepted: November 19, 2018

© 2018 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

복합 가능성이 있어 국내외로 유입되어서 정착하여 피해를 주기 때문에 철저한 검역을 실시하고 있다. 검사 방법은 병징이 확인된 시료와 무작위로 선별된 시료를 대상으로 배지에 배양하여 현미경을 통하여 균사나 포자를 관찰하여 판명하였다. 또는 분자적 방법으로 internal transcribed spacer (ITS) region을 대상으로 염기서열을 분석하고 동정하여 판명하고 있다. 현미경 관찰로 판명하기에는 검사자 간의 숙련도나 주관에 따라 검사의 정확도가 영향을 많이 받아 정확한 검사로는 어려움이 있다. ITS region 염기서열 분석을 통한 동정은 진균의 염기서열 데이터가 점점 축적됨에 따라 다른 종의 진균에서 동일한 ITS region 염기서열이 존재함을 알게 되어 정확한 종 동정에 어려움이 나타났다. 그러므로 본 연구에서는 진균의 중간 염기서열이 차이가 많아 종 동정에 사용되는 housekeeping gene인 translation elongation factor 1- α (*tef-1 α*) 유전자와 β -tubulin 유전자 염기서열을 비교 분석하여 탄저병의 원인균인 *C. circinans*의 특이 검출 마커를 개발함에 있다. 그리고 일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법을 사용하여 검출 감도를 측정하고, 검역 현장이나 탄저병 발생 농장에 적용하여 빠른 검출을 위해 감염된 종자나 작물에서 신속하고 정확하게 검출 가능한 PCR 검출법을 개발함에 있다.

재료 및 방법

공시균주와 배양조건

본 연구에 사용된 *Colletotrichum* 속 균주들은 국립농업과학원 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 비교 분석할 *Colletotrichum* 12 종 20 strain을 분양받았으며 KACC에서 보관중인 Centraalbureau voor Schimmelcultures-Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences Collections (CBS-KNAW)의 *C. circinans* 2 개 균주를 분양받았다(Table 1). 그리고 농작물 또는 작물의 표면에서 식하는 부생균으로 흔하게 존재하는 *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. 6균주를 사용하였다. 모든 균주는 potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 25°C 온도조건으로 10~14 일 동안 암조건에서 배양하였다.

C. circinans 특이 검출 PCR 마커 탐색 및 제작

Genomic DNA는 균주를 PDA 배지에 25°C에서 10 일간 암조건에서 배양한 후 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)를 사용하여 추출하였다[6, 7]. TEF728 (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA G-3')과 TEF1 primer (5'-GCC ATC CTT GGA GAG ATA CCA GC-3')를 사용하여 PCR을 통해 *tef-1 α* 유전자를 증폭하였고[8,9], T10 (5'-ACG ATA GGT TCA CCT CCA GAC-3')과 BT12 (5'-GTT GTCAAT GCA GAA GGT CTC-3')를 사용하여 β -tubulin 유전자를 증폭하였다[10, 11]. 증폭된 PCR 산물은 NAVIGen PCR Purification Kit (NAVIBIOTECH, Cheonan, Korea)를 사용하여 정제하고 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)에서 유전자 염기서열을 확인하였다. Clustal Omega 프로그램 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)을 사용하여 분석한 염기서열을 나열하고 유사성을 비교 분석하였다. 중간 차이가 나타나는 염기서열 부분을 바탕으로 *C. circinans* 특이 검출 마커를 각각 *tef-1 α* 와 β -tubulin 유전자에서 디자인하였다.

PCR 마커의 *C. circinans* 특이성 검증

제작된 primer set들의 특이성 검정은 Table 1에 있는 모든 *Colletotrichum* 종들의 strain과 종자 표면에 존재할 가능성이 큰 부생균인 *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. 6가지 속의 진균에 대해서도 수행하였다. PCR 조건은 cirTef-F/cirTef-R set를 사용하였을 때, initial denaturation 95°C에서 3 분, denaturation 95°C에서 30 초, annealing 58°C에서 30 초, extension 72°C에서 30 초 순서로 25 회 반복 수행하고 마지막으로 72°C에서 5 분 반응하여 증폭하였으며, cirTu-F/cirTu-R set를 사용할 때에는 annealing을 50°C로 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 1.5% agarose gel로 100 V, 25 분 동안 전기영동하여 DNA band와 그 size를 확인하였다.

일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법을 이용한 *C. circinans* 검출 감도 분석

제작된 마커의 *C. circinans* 검출 감도를 분석하고자 *C. circinans* DNA를 10 ng/μL 농도로 정량하고 10 배씩 단계적으로 희석하여 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg의 DNA 농도를 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다. 일반 PCR 방법으로는 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara Bio, Kusatsu, Japan)에 단계적으로 희석한 DNA를 주형으로 전체 50 μL로 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set를 앞서 서술한 PCR 조건으로 각각 수행하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 1.5% agarose gel로 100 V, 25 분 동안 전기영동하여 DNA band와 그 size를 확인하였다.

Real-time PCR 분석은 단계적으로 희석한 DNA를 주형으로 전체 부피 25 μL로 SYBR Premix Extaq (Takara Bio)에 각각 첨가하여 PCR 반응액을 만들었다[12]. Real-time PCR 반응 조건은 95°C에서 30 초 반응 후, 95°C에서 5 초와 cirTef-F/cirTef-R set는 58°C에서 30 초, cirTu-F/cirTu-R set는 50°C에서 30 초를

Table 1. *Colletotrichum* strains used in this study.

No.	Fungal strains	Culture collection no.	Host plant
1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 40805	Tomato
2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 43124	Red pepper
3	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 44886	Red pepper
4	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KACC 44887	Grape
5	<i>Colletotrichum boninense</i>	KACC 40893	Cactus
6	<i>Colletotrichum capsici</i>	KACC 46159	Lima Bean
7	<i>Colletotrichum caudatum</i>	KACC 41028	Grass
8	<i>Colletotrichum circinans</i>	CBS 125331	Angelica
9	<i>Colletotrichum circinans</i>	CBS 221.81	Onion
10	<i>Colletotrichum coccodes</i>	KACC 40227	Egg plant
11	<i>Colletotrichum coccodes</i>	KACC 40802	Tomato
12	<i>Colletotrichum dematium</i>	KACC 40013	Red pepper
13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KACC 40003	Red pepper
14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KACC 40448	Apple
15	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KACC 40690	Red pepper
16	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KACC 40892	Cactus
17	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	KACC 40807	Chinese cabbage
18	<i>Colletotrichum lilacearum</i>	KACC 40981	Lily
19	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	KACC 42433	Japan clover
20	<i>Colletotrichum musae</i>	KACC 40947	Banana
21	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KACC 40808	Sweet melon
22	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	KACC 40903	Watermelon

KACC, Korean Agricultural Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

35 회 반복하였으며 Takara Thermal Cycler Dice Real Time System TP800을 사용하여 3 회 반복하여 실험을 수행하였고 TaKaRa DiceRealTime Single 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

C. circinans에 감염된 양파 종자에서의 검출 확인

검역 현장에 적용하기 위하여 양파 종자를 대상으로 *C. circinans*를 감염시켜 실험을 진행하였다. 양파 종자의 표면에는 소독제가 코팅되어 있기에 멸균 증류수를 사용하여 코팅된 소독제를 깨끗하게 씻어 내고 0.25% 차아염소산나트륨으로 표면 살균한 후 멸균 증류수로 남아있는 차아염소산나트륨을 2회 세척하여 제거하였다[13]. PDA 배지에 *C. circinans*를 14 일간 25°C에서 암조건으로 전배양하였다. PDbroth에 표면 살균한 양파 종자 100 개와 전배양한 *C. circinans* 균사 디스크 10 개를 함께 넣어 3 일간 진탕배양(25°C, 200 rpm) 한 후, 4 일간 정치배양하였다. 함께 배양한 종자를 꺼내어 육안으로 탄저병에 감염된 종자를 선별하여 실험에 사용하였다. DNeasy Plant mini kit를 사용하여 선별된 탄저병 감염 종자에서 DNA 추출하였고 앞서 수행한 일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법을 통해 검출 능력을 조사하였다.

결과 및 고찰

C. circinans 특이 검출 마커 개발

Clustal Omega 프로그램을 사용하여 분석한 *tef-1α*와 β -tubulin 유전자 염기서열을 alignment하여 유사성을 비교하였다. *Colletotrichum*종 간 염기서열이 많이 차이가 나는 부분을 찾아 *tef-1α* 유전자에서 cirTef-F/cirTef-R set를 디자인하였고 β -tubulin 유전자에서 cirTu-F/cirTu-R set를 디자인하였다. 제작된 특이 검출 마커는 cirTef-F/cirTef-R set는 253 bp, cirTef-F/cirTef-R set는 115 bp를 증폭할 수 있게 디자인하였다(Fig. 1, 2, Table 2).

C. circinans 검출 마커의 특이성 검증

제작된 *C. circinans* 검출 마커인 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set를 각각 사용하여 *C. circinans* 2 개 균주를 포함하여 *Colletotrichum* 13 종, 22 strain과 부생균으로 존재하는 *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. 6 개 속 진균의 DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. 그 결과 *C. circinans* DNA에서만 cirTef-F/cirTef-R set를 사용하였을 경우 253 bp size의 band와 cirTu-F/cirTu-R set를 사용하였을 경우에는 115 bp size의 band를 확인하였고 다른 종의 *Colletotrichum* 종에서는 band가 확인되지 않았다(Fig. 3, 4). *C. circinans* DNA와 6 개 속의 부생균의 DNA가 섞여 있을 경우에는 증폭이 잘 되었지만, 6 개 속 진균의 DNA만 섞여 있을 경우에는 증폭되지 않았다. 이 결과는 본 연구에서 제작한 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set 둘 다 *C. circinans*를 특이적으로 검출할

Table 2. Primers designed in this study

Fungal species	Target gene	Primers	Sequences (5'-3')	Size (bp)
<i>Colletotrichum circinans</i>	<i>tef-1α</i>	cirTef-F	TTATAACCATGGACATCATTCTGACCATC	253
		cirTef-R	AAGAITTTGAGTTAGTCACGTCGAAAATCCA	
	β -tubulin	cirTu-F	CGTAAGTCTATCTCCTGATCCCG	115
		cirTu-R	CCGTCATGTCGACGTCTGAA	

tef-1α, translation elongation 1- α .

수 있다는 것을 보여준다.

일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법의 검출 감도 평가

C. ciminans DNA 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg의 농도로 일반적인 PCR을 수행한 결과 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set의 검출 감도는 각각 100 pg 과 1 ng으로 확인 되었다(Fig. 5). Real-time PCR 방법으로는 Threshold cycle (Ct) 값은 거의 동일하게 나타났으며 반응산물을 모니터링 한 결과 cirTef-F/cirTef-R set는 10 pg 수준까지, cirTu-F/cirTu-R set는 100 pg 수준까지 30 회 이내에 peak 을 확인하였다(Fig. 6). 산출된 표준 곡선의 PCR efficiency는 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set 각

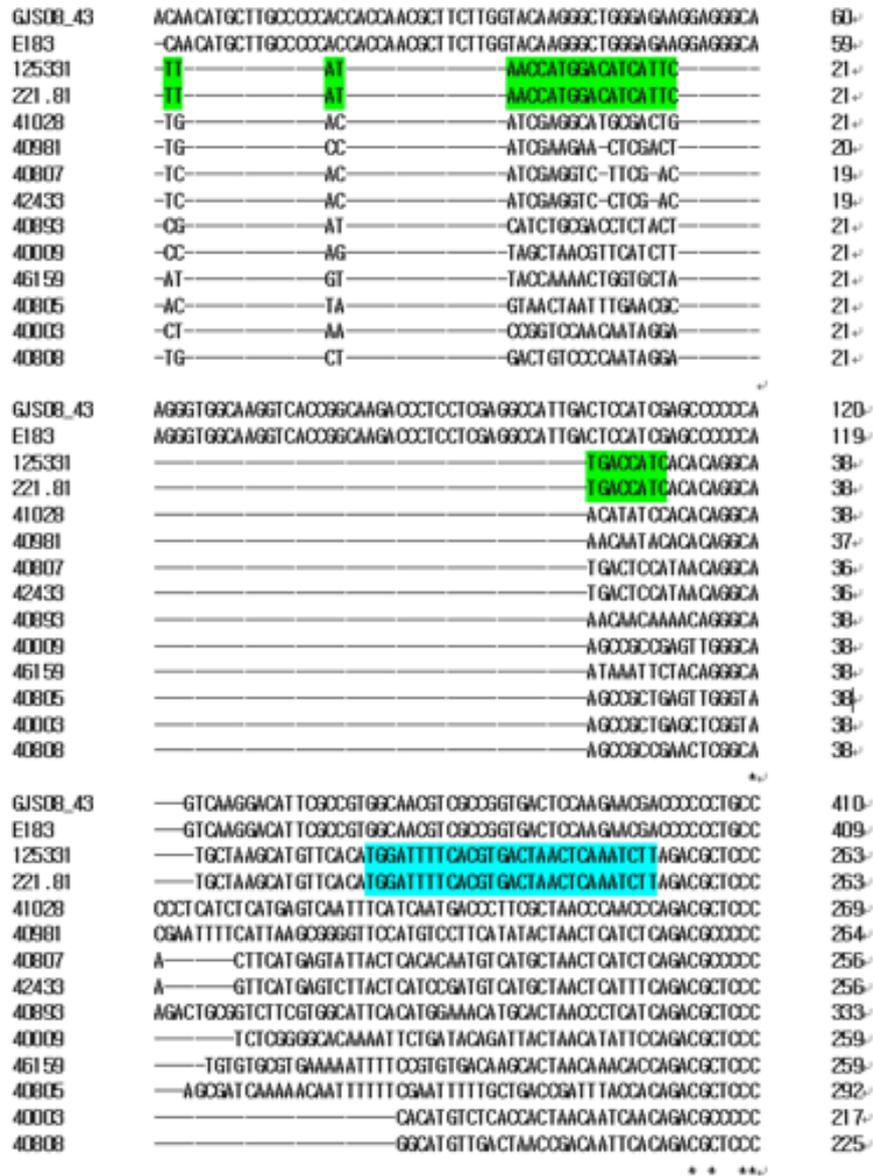


Fig. 1. Sequence alignment of translation elongation 1- α genes of *Colletotrichum* spp. used in this study. Green and sky-blue boxed sequences indicate respectively the position of the designed primer cirTef-F and cirTef-R. GJS08_43: *C. theobromicola*, E183: *C. ignotum*, 125331: *C. circinans*, 112.81: *C. circinans*, 41028: *C. caudatum*, 40807: *C. higginsianum*, 42433: *C. lindemuthianum*, 40893: *C. boninense*, 40009: *C. coccodes*, 46159: *C. capsici*, 40805: *C. acutatum*, 40003: *C. gloeosporioides*, 40808: *C. orbiculare*.

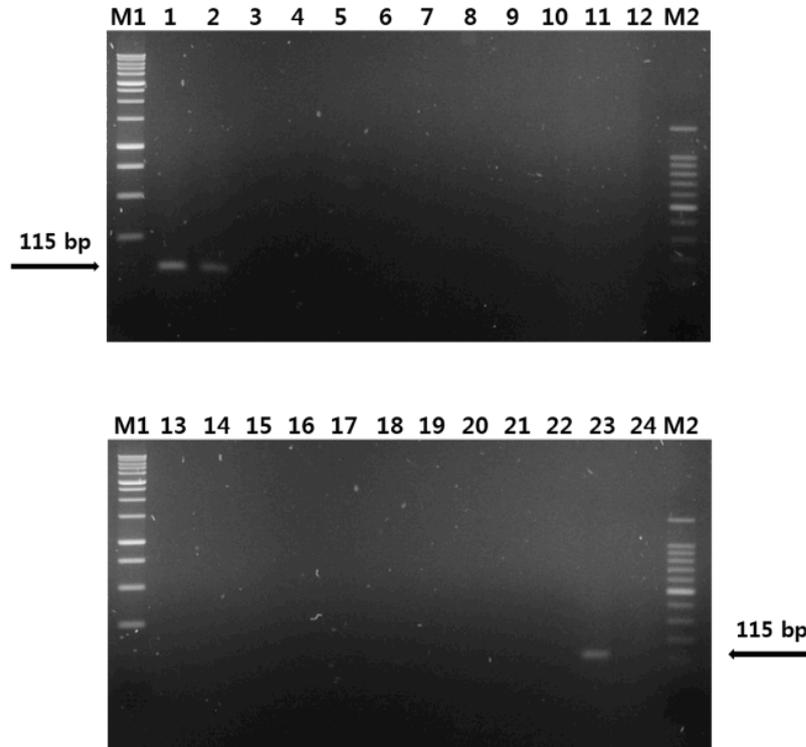


Fig. 4. Specificity test of the primer cirTu-F/cirTu-R set against DNAs of common six molds. M1, 1 kb DNA ladder; 1, *Colletotrichum circinans* CBS 125331; 2, *C. circinans* CBS 221.81; 3-6, *C. acutatum* KACC 40805, 43124, 44886, 44887; 7, *C. boninense* KACC 40893; 8, *C. capsica* KACC 46159; 9, *C. caudatum* KACC 41028; 10, 11, *C. coccodes* KACC 40227, 40808; 12, *C. dematium* KACC 40013; 13-16, *C. gloeosporioides* KACC 40003, 40448, 40690, 40892; 17, *C. higginsianum* KACC 40807; 18, *C. liliacearum* KACC 40947; 19, *C. lindemuthianum* KACC 42433; 20, *C. musae* KACC 40947; 21, *C. orbiculare* KACC 40808; 22, *C. orbiculare* KACC 40903; 23, DNA mixture of *C. circinans* CBS 221.81 and common six molds (*Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp.); 24, DNA mixture of common six molds; M2, 100 bp DNA ladder.

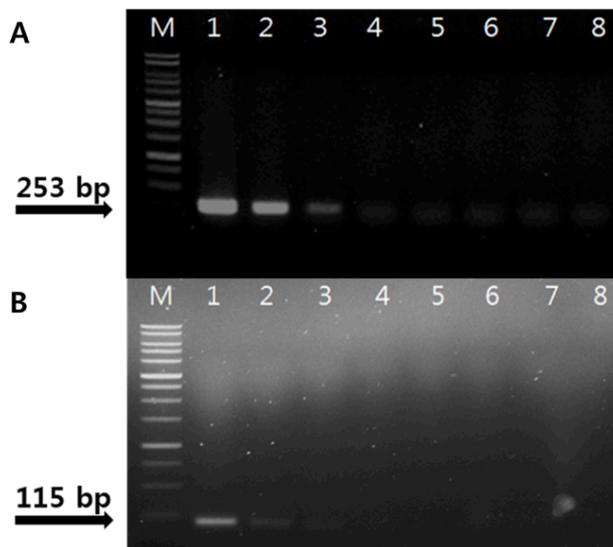


Fig. 5. Conventional PCR amplification of different amounts of *Colletotrichum cirminans* DNA with the primers cirTef-F/cirTef-R (A) and cirTu-F/cirTu-R (B). M, 1 kb ladder marker; 1, 10 ng; 2, 1 ng; 3, 100 pg; 4, 10 pg; 5, 1 pg; 6, 100 fg; 7, 10 fg; 8, 1 fg.

각 104.4%와 103.8%, 기울기는 -3.221과 -3.235이고 상관계수 R² 값은 0.998과 0.999로 수행한 real-time PCR 방법은 신뢰도가 높은 수준임을 나타낸다.

C. circinans에 감염된 종자에서 검출 확인

C. circinans에 감염된 양과 종자를 선별하여 DNA를 추출하고 일반 PCR과 real-time PCR 방법으로 C. circinans 검출이 가능한지 확인하였다. 검출 민감도가 더 높았던 cirTef-F/cirTef-R set를 사용하였고 일반 PCR의 경우 target band인 253 bp에서 band가 나타났고 이것으로 보아 감염된 종자에서 검출이 가능하였다(Fig. 7). 그리고 real-time PCR 방법에서도 위의 결과에 같이 melting peak가 나타나 동일하게 증폭되는 것을 확인하였다(Fig. 8). 이러한 결과는 제작한 cirTef-F/cirTef-R set가 일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법 두 가지 모두 C. circinans가 감염된 종자에서 C. circinans를 검출할 수 있다는 것을 보여준다.

최근 계통학적 연구를 통해 Colletotrichum속은 복잡한 complex를 구성을 하고 있다[14]. 총 9개의 complex를 구성하고 있으며 C. dematium, C. lineola, C. fucti, C. anthrisci, C. spinaciae, C. circinans는 C. dematium complex group에 속하고 있다. 본 연구에는 C. dematium종만 포함이 되어있고 나머지 종들은 함께 실험하고자 하였으나 Colletotrichum종들은 대부분이 국내외로 검역대상 균주이기에 분양에 어려움이 있다. 그러므로 C. lineola, C. fucti, C. anthrisci, C. spinaciae는 tef1- α 유전자와 β -tubulin 유전자 염기서열을 제작한 특이 검출 마커와 비교하였다. tef1- α 유전자는 NCBI database에 등록된 염기서열이 거의 없어 분석이 어려웠고 β -tubulin 유전자 염기서열을 NCBI database에서 받아 비교 분석하였다. C. lineola, C. fucti, C. anthrisci는 C. circinans와 염기서열 차이가 많이 나타났고 C. spinaciae는 상동성이

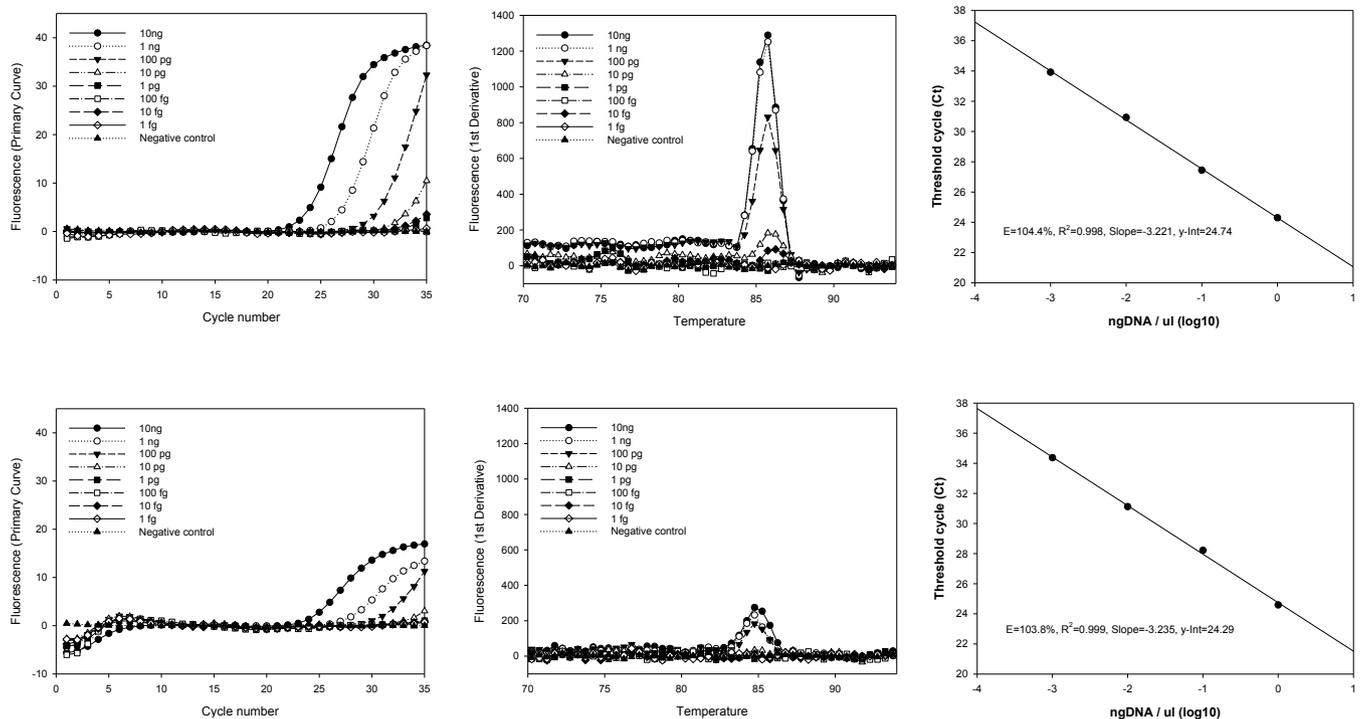


Fig. 6. Real-time PCR amplification of *Colletotrichum circinans* DNA with the primers cirTef-F/cirTef-R (A) and cirTu-F/cirTu-R (B). a, Amplification plot; b, Melting peak analysis; c, Standard curve. Sample 1, 10 ng; Sample 2, 1 ng; Sample 3, 100 pg; Sample 4, 10 pg.

높았다. 하지만 제작된 특이 검출 마커 염기서열 부분에서는 forward와 reverse에서 각각 2 개의 base 의 차이가 나타나 *C. circinans*만 특이적으로 검출될 가능성이 높다. 향후 *C. spinaciae*를 포함하여 *C. lineola*, *C. fucti*, *C. anthrisci*는 제작된 특이 검출 마커로 PCR을 수행하여 확인하여야 할 것이다.

본 연구는 *tef1-α* 유전자와 β -tubulin 유전자를 타겟으로 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set를 제작하여 *Colletotrichum*종뿐만 아니라 부생균으로 흔하게 존재하는 6 개 속의 곰팡이에 대해서도 특이적으로 *C. circinans*가 검출이 가능하였다. 그리고 PCR 증폭 산물의 크기가 cirTef-F/cirTef-R set는 253 bp이고 cirTu-F/cirTu-R set는 115 bp로 작기에 PCR 반응 시간도 단축시킬 수 있어 검출 시간을 더욱 절약할 수 있다. 또한 감염된 종자에서도 검출이 가능하였기에 국내외로 채소 및 채소 종자를 수입 또는 수출할 때 *C. circinans*감염 여부를 신속하게 파악하여 식물검역 작업을 단축시킬 수 있을 것으로 생각된다.

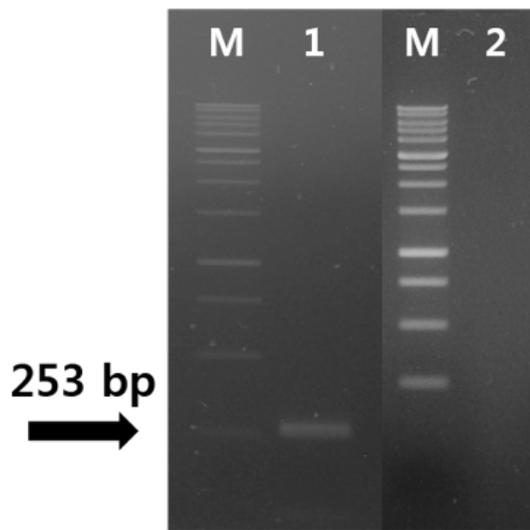


Fig. 7. Detection of *Colletotrichum circinans* by conventional PCR using the primer set cirTef-F/cirTef-R in DNA from infected seeds. M, 1 kb ladder marker; 1, Infected onion seed; 2, Control onion seed.

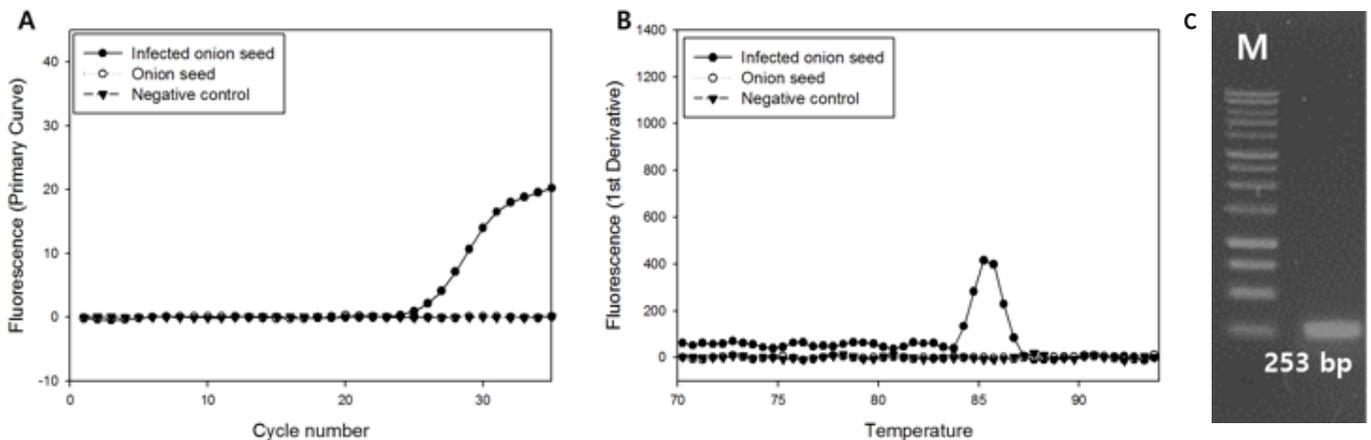


Fig. 8. Detection of *Colletotrichum circinans* by real-time PCR using the primer set cirTef-F/cirTef-R in DNA from infected onion seeds. A, Amplification plot; B, Melting peak analysis; C, Gel electrophoresis; M, 1 kb ladder marker.

적요

탄저병균인 *Colletotrichum circinans*는 세계적으로 양파에 심각한 피해를 주는 병원균이다. 본 연구에서는 일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법으로 *C. circinans*를 정확하면서도 쉽고 빠르게 검출이 가능한 특이 마커를 개발하였다. *tef-1α* 유전자와 β -tubulin 유전자를 분석하여 *C. circinans*를 특이적으로 검출할 수 있는 cirTef-F/cirTef-R set와 cirTu-F/cirTu-R set를 제작하였다. 일반 PCR 방법으로 cirTef-F/cirTef-R set는 100 pg, cirTu-F/cirTu-R set는 1 ng까지 검출이 가능하였고 real-time PCR 방법으로는 각각 10 pg, 100 pg까지 검출이 가능하였다. *C. circinans*에 인공적으로 감염된 양파 종자에서도 cirTef-F/cirTef-R set를 사용하여 일반 PCR 방법과 real-time PCR 방법 모두 *C. circinans* 검출이 가능하였다. 본 연구에서 개발한 *C. circinans* 특이 검출 마커는 수출입 되는 채소 및 종자에서 빠르고 정확하게 탄저병균인 *C. circinans*를 검출하는데 사용될 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Animal and Plant Quarantine Agency.

REFERENCES

1. Sherf AF, MacNab AA. Vegetable diseases and their control. 2nd ed. New York: John Wiley; 1986.
2. Agrios GN. Plant pathology. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005.
3. Sherriff C, Whelan MJ, Arnold GM, Lafay JF, Brygoo Y, Bailey JA. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. Exp Mycol 1994;18:121-38.
4. Lees AK, Hilton AJ. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. Plant Pathol 2003;52:3-12.
5. Kiehr M, Delhey R, Azpilicueta A. Smudge and other diseases of onion caused by *Colletotrichum circinans*, in southern Argentina. Phyton (B Aires) 2012;81:161-4.
6. Tengel C, Schüssler P, Setzke E, Balles J, Sprenger-Haussels M. PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. BioTechniques 2001;31:426-9.
7. Haugland RA, Brinkman N, Vesper SJ. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. J Microbiol Methods 2002;50:319-23.
8. Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 1999;91:553-6.
9. Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 2002;94:146-70.
10. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types with in a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol 1997;7:103-16.
11. Loppnau PA, Breuil C. Species level identification of conifer associated *Ceratocystis* sapstain fungi by PCR-RFLP on a β -tubulin gene fragment. FEMS Microbiol Lett 2003;222:143-7.

12. Yun YH, Suh DY, Kim HJ, Kim SH. Specific and sensitive detection of *Phoma glomerata* using PCR techniques. *Kor J Mycol* 2013;41:52-5.
13. Kim JY, Jang SW, Kim HJ, Kim SH. Molecular markers for the rapid detection of *Colletotrichum coccodes*, an anthracnose pathogen of tomato. *Kor J Mycol* 2018;46:186-92.
14. Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Stud Mycol* 2012;73:181-213.